



EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE DES PLANTES UTILISEES AU CONGO BRAZZAVILLE DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES PARASITAIRES

¹ P.R. ONGOKA, ²M. DIATEWA, ³R. AMPA, ³EKOUYA A.,
³OUAMBA J.M., ⁴GBEASSOR M., ²A.A. ABENA

¹Ecole Normale Supérieure, Université Marien Ngouabi, B.P. 69, Brazzaville, Congo
²Faculté des Sciences de la Santé, Université Marien Ngouabi, B.P. 69, Brazzaville, Congo
³Faculté des Sciences et Techniques, Université Marien Ngouabi, Brazzaville, Congo
⁴Faculté des Sciences, Université de Lomé, Togo

RESUME

Les extraits de 20 plantes médicinales ont été évalués *in vitro* pour leur activité anthelminthique. *Lombricus terrestris* a été utilisé comme modèle animal. Le Levamisol (2, 5 et 10 mg/l) a été utilisé comme substance de référence. Les activités anthelminthiques ont été déterminées aux doses d'extraits aqueux de 5, 10, 15, 20 et 25 mg/l. Les résultats ont été exprimés en termes de temps d'apparition de l'hypermobilité et de temps de létalité du lombric. L'activité vermicide est dose-dépendante pour 19 plantes. Seule *Heinsia critina* a présenté un potentiel vermicide très faible aux doses étudiées.

Mots-clés : *Activité anthelminthique ; Activité vermicide ; Lombric terrestris ; Ver de terre ; Plantes médicinales.*

ABSTRACT

The extracts of 20 medicinal plants were tested *in vitro* for anthelmintic activity against earth worms (*Lombricus terrestris*). Levamisol was used as reference standard at various concentrations (2, 5, and 10 mg/l). The anthelmintic activities were evaluated at doses of 5, 10, 15, 20 and 25 mg/l of the aqueous extracts. The results were expressed in terms of time taken for hypermobility and time for death of worms. The aqueous extracts of 19 plants showed dose-dependent vermicide activities. Only, *Heinsia critina* exhibited very low vermicide activity at these doses.

Key Words: *Anthelmintic Activity; Vermicide Activity; Lombric terrestris; Earth worms; Medicinal Plants.*

INTRODUCTION

Les helminthiases chez l'homme, qui sont dues entre autres aux cestodes, nématodes et trématodes, constituent un problème de santé publique dans les pays en développement [1].

Les helminthiases sont traitées par des médicaments modernes et, dans les pays en développement, en raison du coût élevé de ces derniers, par des plantes médicinales [2, 3].

Par ailleurs, il a été noté des phénomènes de résistance des parasites à certaines substances anthelminthiques [4-8]. Aussi, des stratégies sont élaborées pour découvrir et développer de nouvelles molécules à potentialité anthelminthique.

C'est dans ce cadre que nous avons entrepris l'évaluation *in vitro* de l'activité anthelminthique d'une vingtaine de plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle congolaise dans le traitement des maladies parasitaires [9-11].

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Matériel animal

Le lombric (*Lombricus terrestris*) a été utilisé comme modèle animal pour réaliser cette étude du fait qu'il est, d'une part proche des helminthes, et d'autre part facilement accessible [12-14].

Les lombrics ont été prélevés à Brazzaville, aux abords de la rivière « Tsiémé » et dans la réserve maraîchère de Talangai, précisément sur les bordures du fleuve Congo.

Matériel Végétal

Il est constitué de feuilles, de racines, de tiges et d'écorces des vingt plantes les plus utilisées (Tableau I). Celles-ci ont été récoltées pendant les enquêtes, puis séchées à l'abri des rayons solaires et de la poussière. Les

différentes parties séchées ont été réduites en poudre en vue de la préparation des extraits.

Méthodes

Culture des lombrics

Le sable ordinaire a été préalablement lavé avec l'eau distillée, puis stérilisé pendant 48 heures. Cent (100) g de sable ont été placés dans une boîte de pétri utilisée comme bac de survie. Trente cinq (35) ml d'eau distillée y ont été ajoutés. Après homogénéisation par agitation, 5 lombrics y ont été placés ; leur comportement a été observé pendant 24 à 72 heures, voire une semaine.

Préparation des extraits

Deux types d'extraits ont été préparés : l'extrait méthanolique de *Milletia versicolor* et l'extrait aqueux de toutes les plantes.

Extrait méthanolique : A la poudre végétale a été ajouté le méthanol. Après une extraction continue, le méthanol a été éliminé par évaporation au rotavapor. Le résidu obtenu a constitué l'extrait méthanolique.

Extrait aqueux : La poudre végétale a été portée à ébullition pendant 10 minutes dans l'eau distillée. Après refroidissement à la température ambiante de la solution, celle-ci a été filtrée. Le filtrat ainsi obtenu a représenté l'extrait aqueux.

Méthode d'évaluation de l'activité anthelminthique

La méthode de Guissou et al [14] a été utilisée pour la recherche de l'activité vermicide. L'expérimentation a porté sur trois lots :

- lot 1 ou lot témoin comprenant 5 lombrics traités avec l'eau distillée ;
- lot 2 constitué de 6 sous-lots correspondant aux 6 concentrations de chacun des extraits : 2, 5, 10, 15, 20 et 25 mg/ml. Chaque sous-lot comptait 5 lombrics ;

- lot 3 ou lot de référence pourvu de 5 lombrics traités avec le produit de référence, le Levamisole aux concentrations de 2, 5 et 10 mg/l.

Pour chaque concentration de l'extrait, l'expérience a été répétée 5 fois.

L'évolution des lombrics, c'est-à-dire leur comportement et leur létalité, a été observée pendant 72 heures. Le syndrome d'intoxication s'est manifesté par une hypermobilité des lombrics dont la mort est marquée par la lyse parasitaire après inanition de courte ou longue durée.

Pour chaque concentration de l'extrait, le temps d'apparition de l'hypermobilité des

lombrics ou délai d'action a été noté. Il en est de même du temps au bout duquel la dose de l'extrait a occasionné la mort de tous les lombrics placés dans la boîte de Pétri ; ce temps est encore appelé temps de létalité 100 %.

L'effet vermicide a été considéré comme efficace lorsque le temps d'apparition de l'hypermobilité était court : 1 à 6 heure(s).

Plus le temps d'apparition de l'hypermobilité et celui de létalité 100 % sont courts, plus l'extrait possède une activité vermicide élevée.

Tableau I : Liste des plantes étudiées

Espèces	Familles
1. <i>Acanthospermum hispidum</i> DC	Asteraceae
2. <i>Alchomea cordifolia</i> (Schum. & Thonn.) Müll.Arg	Euphobiaceae
3. <i>Boerhavia diffusa</i> Auct. ou <i>Boerhavia repens</i> L.	Nyctaginaceae
4. <i>Bridelia ripicola</i> J.Léonard	Phyllanthaceae
5. <i>Caloncoba welwitschii</i> (Oliv.) Gilg ou <i>Oncoba welwitschii</i> Oliv.	Flacourtiaceae
6. <i>Dissotis rotundifolia</i> Auct.	Melastomataceae
7. <i>Funtumia elastica</i> (P. Preuss) Staf	Apocynaceae
8. <i>Garcinia huillensis</i> Welw. ex Oliv.	Clusiaceae
9. <i>Heinsia critina</i> (Afzel.) G. Taylor	Rubiaceae
10. <i>Loranthus</i> sp.	Loranthaceae
11. <i>Luffa cylindrica</i> M. Roem.	Cucurbitaceae
12. <i>Manilkara koechlinii</i> Aubrev. & Pellgr.	Sapotaceae
13. <i>Millettia versicolor</i> Welw. ex Baker	Fabaceae
14. <i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae
15. <i>Nauclea latifolia</i> SM. ou <i>Sarcocephalmus latifolius</i> (Sm.) E.A. Bruce	Rubiaceae
16. <i>Pausinystalia macroceras</i> (K. Schum.) E.A. Bruce	Rubiaceae
17. <i>Pentadiplandraceae brazzeana</i> Baill.	Pentadiplandraceae
18. <i>Tetracera alnifolia</i> Wild	Dilleniaceae
19. <i>Trema guineensis</i> (Schum. & Thonn.) Ficalho ou <i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Ulmaceae
20. <i>Vernonia amygdalina</i> Delile ou <i>Gymnanthemum amygdalinum</i> (Delile) Sch. Bip. ex Walp;	Asteraceae

RESULTATS

Sur la base des critères définis pour évaluer l'effet vermicide des extraits sur le ver de terre, *Lombricus terrestris*, on a pu noter :

- dix plantes présentant une activité vermicide élevée, avec des temps d'apparition de l'hyperactivité et des temps de létalité 100 %, compris, respectivement, entre 5 mn et 7 h, et 10 mn et 10 h ;
- trois plantes possédant une activité vermicide modérée, avec des temps d'apparition de l'hyperactivité et des temps de létalité 100 % compris, respectivement, entre 8 h et 16 h, et 11 h et 30 h ;
- six plantes exhibant une activité vermicide faible, avec des temps d'apparition de

l'hyperactivité et de létalité 100 % compris, respectivement, entre 17 h et 48 h, et 31 h et 72 h ;

- une plante à activité vermicide très faible, induisant une hypermobilité des lombrics (temps d'apparition de l'hyperactivité égal à 24 h), mais sans entraîner leur mort. (Tableaux II et III).

Par ailleurs, le temps de létalité 100 % est dose-dépendant; plus la dose de l'extrait est élevée, plus le temps de létalité 100 % est court (Tableau II).

De plus, le solvant d'extraction des substances actives intervient significativement dans l'effet vermicide des extraits de *Milletia versicolor* (Tableaux II et III).

Tableau II : Répartition du temps de létalité 100 % en fonction de la dose de l'extrait

Extraits	Temps de létalité 100 %											
	1 h	2 h	3 h	4 h	7 h	9 h	12 h	24 h	36 h	42 h	48 h	72 h
	Dose de l'extrait (mg/ml)											
<i>Acanthospermum hispidum</i>	-	-	-	-	25	-	15 ; 20	-	-	-	-	-
<i>Alchomea cordifolia</i>	-	25	20	-	15	-	10	-	-	-	-	-
<i>Boerhavia repens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	25	20	15	-
<i>Bridelia ripicola</i>	-	-	-	25 ; 20	15 ; 10	5	-	-	-	-	-	-
<i>Dissotis rotundifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	20 ; 25	-	-	-
<i>Funtumia elastica</i>	-	-	25	20	10 ; 15	-	-	-	-	-	-	-
<i>Garcinia huillensis</i>	-	-	25	20	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gymnanthemum amygdalinum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-
<i>Heinsia critina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Loranthus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
<i>Luffa cylindrica</i>	-	-	-	-	-	25	15 ; 20	10	-	-	-	-
<i>Manilkara koechlinii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	20	-
<i>M. versicolor</i> - Ext. Aq.	-	-	25	-	15 ; 20	-	10	-	5	-	-	-

- Ext. M.	20	15	5 ; 10	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Momordica charantia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20; 25	-
<i>Oncoba welwitschii</i>	-	-	-	-	25	-	10	-	-	-	-	-
<i>Pausinystalia macroceras</i>	-	-	-	-	-	-	25	20	10	-	-	-
<i>Pentadiplandraceae brazzeana</i>	-	-	-	-	-	25	20	15	-	-	-	-
<i>Sarcocephalmus latifolius</i>	-	-	-	25	15 ; 20	5; 10	-	-	-	-	-	-
<i>Tetracera alnifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	20
<i>Trema orientalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20; 25	15
Substance de référence : Levamisol	2 ; 5 ; 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ext. Aq. : Extrait aqueux ; Ext M. : Extrait méthanolique

Tableau III : Répartition des extraits selon le délai d'action et le temps de létalité 100 %

Extraits (25 mg/ml)	Délais d'action (en heure)	Temps de létalité 100 % (en heure)
Substance de référence : Levamisol	<1/4 heure	<1/2 heure
<i>Millettia versicolor</i>		
- Extrait aqueux	<2	3
- Extrait méthanolique	<1	1
<i>Alchomea cordifolia</i>	2	2
<i>Bridelia ripicola</i>	2	5
<i>Funtumia elastica</i>	2	3
<i>Garcinia huillensis</i>	2	3
<i>Luffa cylindrica</i>	3	9
<i>Oncoba welwitschii</i>	3	7
<i>Sarcocephalmus latifolius</i>	3	5
<i>Pentadiplandraceae brazzeana</i>	5	9
<i>Acanthospermum hispidum</i>	6	8
<i>Boerhavia repens</i>	12	30
<i>Gymnanthemum amygdalinum</i>	12	>36
<i>Pausinystalia macroceras</i>	16	16
<i>Dissotis rotundifolia</i>	24	36
<i>Heinsia critina</i>	24	-
<i>Tetracera alnifolia</i>	24	48
<i>Manilkara koechlinii</i>	24	36
<i>Momordica charantia</i>	24	48
<i>Trema orientalis</i>	24	48
<i>Loranthus sp</i>	48	72

DISCUSSION

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que seul l'extrait de *Heinsia critina* présente une activité vermicide très faible à la dose de 25 mg/l.

Bouquet [10] a indiqué l'usage du décocté de *Heinsia critina* comme vermifuge. L'eau, utilisée comme solvant d'extraction des composés anthelminthiques contenus dans l'extrait de *Heinsia critina*, serait vraisemblablement à l'origine de la très faible activité vermicide. Ces composés auraient probablement une nature non polaire. En effet, l'étude comparative des solvants d'extraction, eau et méthanol, réalisée sur *Millettia versicolor* dans la présente étude, révèle que l'extraction des substances chimiques est fonction de la polarité des solvants utilisés : l'activité vermicide de l'extrait méthanolique est plus élevée que celle de l'extrait aqueux (Tableaux II et III). De plus, les travaux de Vidyadhar *et al.* [15] sur l'efficacité des solvants dans l'extraction des composés à potentiel anthelminthique de *Enicostemma littorale*, ont montré l'ordre d'efficacité d'extraction décroissant suivant : éthanol > acétate d'éthyl > eau > chloroforme > hexane.

Par ailleurs, il a été montré que l'activité anthelminthique des extraits aqueux de diverses plantes, testée sur d'autres espèces de lombric, est significativement très prononcée aux doses comprises entre 50 et 200 mg/l [15-22]. Aussi, la dose de l'extrait de *Heinsia critina* (25 mg/l), bien qu'induisant une hypermobilité des lombrics (intoxication), serait probablement insuffisante pour entraîner leur mort.

La présente étude révèle que les extraits aqueux des plantes engendrent une létalité 100 % des lombrics au bout d'un temps élevé (3 à 72 h), comparativement aux résultats d'autres chercheurs ayant travaillé sur d'autres espèces de lombric et d'autres plantes (temps de létalité inférieur à 3 h) [15-22]. Les doses d'extraits aqueux utilisées pour obtenir le temps de létalité 100 % expliqueraient les différences observées.

Les profils chimiques réalisés par bien de chercheurs sur les plantes étudiées ont révélé la présence des flavonoïdes et des tannins [19, 21, 23-26].

Des études ont montré que les flavonoïdes et les tanins sont impliqués dans l'activité anthelminthique [15, 16, 27, 28]. Ainsi, l'activité vermicide des extraits des plantes, observée dans la présente étude, serait vraisemblablement due aux flavonoïdes et /ou tanins. Ces derniers inhibent la phosphorylation oxydative des helminthes [28, 29]. En outre, ils se fixent sur une glycoprotéine, le collagène, qui joue le rôle protecteur de la cuticule du parasite. Cette fixation induit un dommage de la cuticule, puis la mort de l'helminthe [15, 30].

CONCLUSION

Au moyen du lombric, l'activité anthelminthique des extraits aqueux de 20 plantes utilisées au Congo dans le traitement des maladies parasitaires a été vérifiée *in vitro*. Cependant, il reste à évaluer cette activité en utilisant les helminthes couramment rencontrés chez l'homme et les animaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bundy D.A., 1994. Immunoepidemiology of intestinal helminthic infection: The global burden of intestinal nematode disease. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*; 8: 259-261.
2. Mali G.R., Mehta A.A., 2008. A review of anthelmintic plants. *Natural Product Radiance*; 7 (5): 466-475.
3. Satyavati G.V., 1990. Use of plant drugs in Indian traditional systems of medicine and their relevance to primary healthcare. In: Farnsworth N.R. and Wagner H. (eds), *Economic and medicinal plant research, 4, plant and traditional medicine*. London: Academic Press Ltd
4. Almeida F.A., Garcia K.C.O.D., Torgerson P.R., Amarante A.F.T., 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Brazil Parasitol Int*; 59: 622-625.
5. Chartier C., Soubirac F., Pors I, Silvestre A., Hubert J., Couquet C., Cabaret J., 2001. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in

- southwestern France. *J Helmitol*; 75: 325-330.
6. Kotze C.A., Dobson R.J., Tyrrell K.L., Stein P.A., 2002. High-level ivermectin resistance in a field isolate of *Haemonchus contortus* associated with a low of resistance in the larval stager: implications resistance detection. *Vet Parasitol*; 108: 255-263.
 7. Waller P.J., 1997. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* ; 72 : 391-405.
 8. Walter P.J., Prichard K.K., 1985. Chemotherapy of parasitic infections. In : Campbell W.C. and Rew L.S. (eds). New York: Plenum, pp. 278-539.
 9. Adjanohoun E.E., 1988. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du Congo. Paris : ACCP, 159p.
 10. Bouquet A., 1969. Féticheur et médecine traditionnelle du Congo Brazzaville. Paris : ORSTOM, 282 p.
 11. Ongoka P.R., Abena A.A., Motom M., Ngoliele A., Ekouya A., Diatewa M., Okémy-Andissa N., Attie R., 2004. Etude ethnopharmacologique de quelques plantes anthelminthiques du Congo Brazzaville. *Rev Méd Pharm. Afr* ; 18 : 153-159.
 12. Aron M., Grasse P., 1966. Précis de biologie animale. Paris : Masson et Cie, pp. 878-879.
 13. Grasse P.P., Doumenc D., 1995. Invertébrés, tome 1. Paris : Masson, pp.112-119.
 14. Guissou L.P., Ouedraogo S, Sanfo A., Some N., Lompo M., 1988. Mise au point d'un modèle biologique de test antiparasitaire appliqué aux plantes médicinales. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* ; 10 : 105-133.
 15. Vidyadhar S., Saidulu M., Gopal T.K., Chamundeeswari D., Umamaheswara Rao, Banji D., 2010. In vitro anthelmintic activity of the whole plant of *Enicostemma littorale* by using various extracts. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*; I (3): 1119-1125.
 16. Deore S.L., Khadabadi S.S., Kamdi K.S., Ingle V.P., Kawalkar N.G., Sawarkar P.S., Patil U.A., Vyas A.J., 2009. In vitro anthelmintic activity of *Cassia tora*. *Int J Chem Tech Res*; 1 (2): 177-179.
 17. Satish B.K., Ravindra A.F., 2009. Investigation of in vitro anthelmintic activity of *Thespesia lampas* (Cav.); 2 (2): 69-71.
 18. Ashok Kumar B.S., Lakshman K., Jayaveera K.N., Nandeesh R., Manoj B., Ranganayakulu D., 2010. Comparative in vitro anthelmintic activity of three plants from the Amaranthaceae family. *Arch Biol Sci Belgrade*; 62 (1): 185-189.
 19. Roy H., Chakraborty A., Bhanja S., Nayak B.S., Mishra S.R., Ellaiah P., 2010. Preliminary phytochemical investigation and anthelmintic activity of *Acanthospermum hispidum* DC. *J Pharm Sci Tech*; 2 (5): 217-221.
 20. Yadu Nandan D., Manas Kumar P., 2011. Evaluation of anthelmintic activity of leaves of *Paederia foetida*. *Int J Pharma Bio Sci*; 2 (1): 227-231.
 21. Partap S., Kumar S., Kumar A., Sharma N.K., Jha K.K., 2012. In vitro anthelmintic activity of *Luffa cylindrica* leaves in Indian adult earthworm. *J Pharmacog Phytochem*; 1 (2): 27-31.
 22. Subach K.R., Jagan Rao N., Binoy Varghese Cheriyan, Muthulakshmi Bhaاراتi, Sandeep Kumar K., 2012. The anthelmintic activity of *Eupatorium triplinerve* and *Alpinia galanga* in *Pheritima posthuma* and *Ascardia galli*: A comparative study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*; 6 (6): 947-950.
 23. Mpiana P.T., Mudogo V., Tshibangu D.S.T., Ngbolua K.N., Shetonde O.M., Mangwala K.P., Mavakala, B.K., 2007. In vitro antisickling activity of anthocyanins extract of a Congolese plant: *Alchornea cordifolia* M. Arg. *J Med Sci*; 7 (7): 1182-1186.
 24. Baba Haruna, Onanuga Adebola, 2011. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial evaluation of three medicinal plants used in Nigeria. *Afr J Trad Compl Alter Mad*; 8 (4): 387-390.
 25. Maitera O.N., Khan M.E., James T.F., 2011. Phytochemical analysis and the chemotherapeutics of leaves and stem-bark of *Nauclea latifolia* grown in Hong, Adamawa State Nigeria. *Asian J Plant Sci Res*; 1 (3): 16-22.
 26. Apu A.S., Liza M.S., Jamaluddin A.T.M., Md Amran Howlader, Kumer Saha R., Rizwan E., Nasrin N., 2012. Phytochemical screening and in vitro bioactivities of the extracts of aerial part of *Boerhavia diffusa* Linn. *Asian Pac J Trop Biomed*; 2 (9): 673-678.
 27. Bate-Smith E.C., 1962. The phenolic constituent of plants and their taxonomic significance, dicotyledons. *J Linn Soc Bot*; 58: 95-103.
 28. Vedha Hari B.N., Saravana Kumar P., Ramya Devi D., 2011. Comparative in vitro anthelmintic activity of the latex of *Ficus Religinosa*, *Ficus elastica* and *Ficus bengalensis*. *J Phytol Phytopharm*; 3 (3): 26-30.
 29. Martin R.J., 1997. Mode of action of anthelmintic drugs. *Vet J*; 154: 11-34.
 30. Thompson D.P., Geary T.G., 1995. The structure and function of helminth surfaces, in *Biochemistry and Molecular Biology of parasites*, 1st ed, New York: Academic Press, pp.203-2032.